บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ฝักกล้วยไม้เอื้องสายน้ำนม อายุ 10 เดือน
2. ตู้ปลอดเชื้อ
3. ปากคีบ
4. มีดผ่าตัด
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
7. เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง
8. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
9. เตาไฟฟ้า
10. แท่งแก้วคนสาร
11. เครื่องแก้ว
12. อุปกรณ์ในการบันทึกผลการทดลอง
13. อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ไมโครปิเปต หลอดทดลองสำหรับเก็บแช่แข็ง
14. ถังไนโตรเจนเหลว

สารเคมี

1. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Modified Vacin and Went (1949)
2. เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
3. น้ำกลั่น
4. น้ำมะพร้าว
5. ผงวุ้น
6. สารเคมีที่ใช้เตรียม สารละลาย PVS2 และ RS
7. ไนโตรเจนเหลว

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

วิธีดำเนินงานวิจัย

การทดลองที่ 1 อิทธิพลของสารปกป้องเนื้อเยื่อพืชต่อการงอกของเมล็ดเอื้องสายน้ำนมภายหลังการเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว

1. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์หรือ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีระยะเวลาในการเติมสารปกป้องเนื้อเยื่อพืช PVS2 10 ระยะเวลา คือ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที เป็นสิ่งทดลอง รวมทั้งหมด 10 สิ่งทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ มีรายละเอียดของสิ่งการทดลอง ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 0 นาที

สิ่งทดลองที่ 2 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 10 นาที

สิ่งทดลองที่ 3 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 20 นาที

สิ่งทดลองที่ 4 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 30 นาที

สิ่งทดลองที่ 5 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 40 นาที

สิ่งทดลองที่ 6 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 50 นาที

สิ่งทดลองที่ 7 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 60 นาที

สิ่งทดลองที่ 8 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 70 นาที

สิ่งทดลองที่ 9 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 80 นาที

สิ่งทดลองที่ 10 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 90 นาที

2. เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Modified Vacin and Went (1949) และเตรียมสารละลาย PVS2 และ RS (ภาพภาคผนวกที่ 1 และ ตารางภาคผนวกที่ 1)

3. นำฝักกล้วยไม้เอื้องสายน้ำนม มาเช็ดผิวภายนอกด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเข้าตู้ปลอดเชื้อมาจุ่มเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟ 2 ครั้ง เพื่อฆ่าเชื้อผิวภายนอก

4. ทำการผ่าฝักกล้วยไม้เอื้องสายน้ำนมในตู้ปลอดเชื้อ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

5. บรรจุเมล็ดกล้วยไม้เอื้องสายน้ำนมลงในหลอดทดลองสำหรับแช่แข็ง จากนั้นเติมสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 10 ระยะเวลา คือ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที

6. เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด นำไปเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

7. นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 นาที จากนั้นนำสารละลาย PVS2 ออก และเติมด้วยสารละลาย RS เป็นระยะเวลา 15 นาที

8. นำเมล็ดกล้วยไม้เอื้องสายน้ำนมมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร Modified Vacin and Went (1949) ทำการสังเกต และเก็บบันทึกข้อมูลจำนวนวันที่เมล็ดงอกและเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องสายน้ำนม

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

การทดลองที่ 2 อิทธิพลของสารปกป้องเนื้อเยื่อพืชต่ออัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มเอื้องสายน้ำนมภายหลังการเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว

1. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์หรือ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีระยะเวลาในการเติมสารปกป้องเนื้อเยื่อพืช PVS2 10 ระยะเวลา คือ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที เป็นสิ่งทดลอง รวมทั้งหมด 10 สิ่งทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ มีรายละเอียดของสิ่งการทดลอง ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 0 นาที

สิ่งทดลองที่ 2 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 10 นาที

สิ่งทดลองที่ 3 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 20 นาที

สิ่งทดลองที่ 4 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 30 นาที

สิ่งทดลองที่ 5 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 40 นาที

สิ่งทดลองที่ 6 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 50 นาที

สิ่งทดลองที่ 7 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 60 นาที

สิ่งทดลองที่ 8 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 70 นาที

สิ่งทดลองที่ 9 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 80 นาที

สิ่งทดลองที่ 10 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 90 นาที

2. เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Modified Vacin and Went (1949) และเตรียมสารละลาย PVS2 และ RS (ภาพภาคผนวกที่ 1 และ ตารางภาคผนวกที่ 2)

3. เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องสายน้ำนมเป็นเวลา 7 วัน

4. บรรจุโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องสายน้ำนมอายุ 7 วัน ใส่ในหลอดทดลองสำหรับแช่แข็ง จากนั้นเติมสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 10 ระยะเวลา คือ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที

5. เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด นำไปเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

6. นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 นาที จากนั้นดูดสารละลาย PVS2 ออก และเติมด้วยสารละลาย RS เป็นระยะเวลา 15 นาที จึงดูดสารละลายออก และนำโปรโตคอร์มเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Modified Vacin and Went (1949)

การเก็บบันทึกข้อมูล

1. จำนวนวันที่ใช้ในการงอก : นับจำนวนวัน ตั้งแต่ที่เริ่มเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องสายน้ำนม จนกระทั่งเมล็ดกล้วยไม้เอื้องสายน้ำนมงอกเป็นโปรโตคอร์ม

2. เปอร์เซ็นต์ความงอก : เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความงอกของกล้วยไม้เอื้องสายน้ำนม และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

3. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต : นับจำนวนโปรโตคอร์มมีการพัฒนา และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลจำนวนวันที่ใช้ในการงอกของเมล็ด เปอร์เซ็นต์ความงอกจำนวนเมล็ด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโปรโตคอร์มเอื้องสายน้ำนม ภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

RAMBHAI BARNI RAJABHAT UNIVERSITY
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
RAMBHAI BARNI RAJABHAT UNIVERSITY
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี